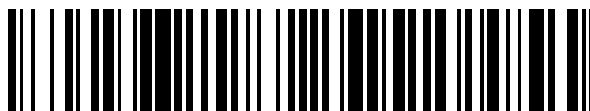


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 300**

51 Int. Cl.:

C07K 5/08	(2006.01)
C07K 5/10	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)
A61P 15/10	(2006.01)
A61P 15/12	(2006.01)
C12R 1/185	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2013 PCT/RU2013/000433**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13151467**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2013 E 13772776 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2876113**

54 Título: **Método para producir un péptido recombinante y péptido resultante**

30 Prioridad:

28.03.2012 RU 2012111965

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2020

73 Titular/es:

**"IVIX" COMPANY LIMITED (100.0%)
Stolovy pereulok, 6
Moscow 121069, RU**

72 Inventor/es:

**MYASOEDOV, NIKOLAY FEDOROVICH;
ANDREEVA, LYUDMILA ALEXANDROVNA y
GOLIKOV, DMITRIY VIKTOROVICH**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 768 300 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para producir un péptido recombinante y péptido resultante

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la bioquímica.

5 Antecedentes de la invención

Se sabe que los péptidos pequeños muestran actividad extremadamente alta, estimulando el auto-curado en los órganos donde se da una perturbación. Como es comúnmente conocido, los péptidos más pequeños se derivaban inicialmente de tejidos animales, y más tarde se aprendió a producirlos en condiciones de laboratorio.

10 Los productos medicinales que contienen péptidos son capaces de restaurar las células corporales dañadas, devolver las funciones perdidas al órgano afectado, y rejuvenecerlo. Los productos medicinales que contienen péptidos se desarrollaron hace más de tres décadas; desde ese momento, cientos de experimentos se han realizado, que probaron la eficacia de péptidos en el tratamiento y prevención de enfermedades de varios sistemas corporales, además de rejuvenecimiento de órganos individuales y de todo el cuerpo.

15 En el cuerpo, los péptidos sirven como mensajeros de información: transfieren información de una célula a otra, de manera que todo podría hacerse bien y en el tiempo. Si una célula funciona apropiadamente, entonces el órgano correspondiente opera bien. Si se da un mal funcionamiento, afecta a todo el órgano, llevando a una enfermedad. Claramente, es posible tratar la enfermedad introduciendo sustancias ausentes en el cuerpo, que este enfoque "dañaría" completamente la célula, y dejaría de funcionar apropiadamente. Por lo tanto, es necesario enviar mensajeros peptídicos a la célula, que la harán funcionar, de manera que el cuerpo se curaría a sí mismo. Cada

20 órgano tiene un suministro de células madre de reserva. Si este suministro se gasta uniformemente, se vive hasta la edad de 100-110. Los péptidos son los mismos para todos los mamíferos. Por lo tanto, si un péptido de ternera se introduce en un humano, su cuerpo la tomará como molécula nativa. El problema principal fue encontrar como aislar péptidos de órganos animales. Esta tecnología se inventó por el Profesor Vladimir Morozov y el Profesor Vyacheslav Havinson en la Academia médica militar tan temprano como en 1971. Se desarrollaron productos medicinales, y entonces, en base a ellos, se hicieron suplementos dietéticos, porque los suplementos dietéticos son fáciles de usar. En sus estudios de los procesos de envejecimiento y métodos para influir en él, los empleados de Instituto de gerontología de San Petersburgo concluyeron que la introducción de péptidos en la dieta del grupo experimental de ratones aumentó su esperanza de vida en 30-38%. Más tarde, se realizaron estudios de péptidos en los ancianos en el Instituto de gerontología de Kiev y en San Petersburgo. Esto mostró la reducción de casi dos veces en la tasa de mortalidad, indicando la alta actividad geroprotectora de los péptidos. El estudio a largo plazo y el uso de productos medicinales peptídicos mostraron su alta eficacia en pacientes de diferentes grupos de edad; sin embargo, la eficacia particular se observó en los ancianos (más de 50 años de edad). La ventaja absoluta de los biorreguladores peptídicos es la ausencia de cualquier reacción adversa. En 26 años, más de 15 millones de personas con diversas patologías recibieron dichos productos. Su eficacia promedió a 75-95%. El déficit de péptidos, que se desarrolla con la edad y los cambios patológicos, acelera significativamente el desgaste de los tejidos y el envejecimiento corporal. El hecho es que un funcionamiento adecuado de células y tejidos necesita cantidades adecuadas de péptidos, que, a su vez, soportan la operación génica óptima. Los péptidos, que funcionan en células específicas para ellos, se sintetizan ahí. Por lo tanto, en los cambios patológicos, además de con la edad, el funcionamiento celular se interrumpe; por tanto, la reproducción peptídica se afecta también. Por consiguiente, la función celular se afecta de forma secundaria. Por

40 consiguiente, la degeneración de tejidos progresa, lo que eventualmente se manifiesta clínicamente. Por tanto, la aplicación de pequeños péptidos es una de las principales innovaciones en la medicina y puede ralentizar significativamente la velocidad de envejecimiento estimulando la proliferación celular y la regeneración tisular, además de mejorar el tiempo de vida celular. Otra ventaja importante de los péptidos es su acción antitumoral. Actualmente, el uso de péptidos es la solución mejor y no comprometedor en la revitalización (rejuvenecimiento corporal) y

45 prevención del cáncer, porque permite rejuvenecer células y tejidos no solo por la regulación y sincronización de todos los procesos cíclicos, sino también aumentando la capacidad de la división celular sin atipia (atipia es una estructura celular incorrecta, o anormalidad).

Por supuesto, en la actual etapa de la técnica, la producción de péptidos pequeños a partir de tejidos animales no es práctica, ya que este método es muy caro, sin mencionar la humanidad del proceso de producción.

50 Un método de producción moderno y avanzado comprende el uso de microorganismos recombinantes. El microorganismo más conveniente es *E. coli*. Las cepas comerciales de *E. coli*, adecuadas para usar en condiciones de laboratorio, tal como *E. coli* K12, *E. coli* 0104, se conocen en la técnica anterior. Estas y similares cepas de *E. coli* conocidas pueden usarse para obtener cepas que producen los pequeños péptidos reivindicados. Un ácido nucleico, que codifica el correspondiente péptido pequeño diana, puede integrarse en cualquier cepa conocida, adecuada para el uso en las condiciones de laboratorio. Los vectores, tales como plásmidos bacterianos, virus, viriones, vectores híbridos que contienen ADN de fago, y plásmidos, se usan para insertar ADN en una célula huésped. Estos vectores incluyen, por ejemplo, cósmidos y fásmidos.

55

Además, es posible producir péptidos mediante síntesis química convencional.

Los péptidos propuestos resuelven el problema de expandir la gama de herramientas para la estimulación de la función reproductiva y sexual y el tratamiento de la disfunción reproductiva y sexual, que esa actualmente relevante. Actualmente, el tratamiento patogenético de dichas patologías se realiza usando psicoterapia, antidepresivos, ansiolíticos, adaptógenos, además de vitaminas, estimulantes basados en plantas comunes; y suplementos dietéticos. Dicho tratamiento es largo, ineficaz y acompañado de muchos efectos secundarios.

Una de las clases más efectivas de sustancias fisiológicamente activas, adecuadas para la producción de estimulantes de la función reproductiva y sexual, es péptidos, que, como sustancias endógenas, no tienen virtualmente efectos secundarios negativos.

- 10 La investigación propia mostró que el heptapéptido Selank con la fórmula general de Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro, un análogo sintético del péptido producido de forma endógena Tuftsina, puede usarse como una herramienta para la prevención y el tratamiento de la disfunción reproductiva y sexual (Patente de la Federación Rusa núm. 2404793). Sin embargo, la síntesis del heptapéptido Selank es multietapa, que aumenta enormemente el coste de los productos medicinales basados en él; además, se expone a proteólisis intensa en el cuerpo, que reduce su efecto estimulante
- 15 en la prevención y el tratamiento de disfunción reproductiva y sexual. Varios oligopéptidos se han descrito en la patente de EE.UU. 3.778.426, además de Wang et al, 2003, *Annals of Neurology*, 54(5):655-664. La solicitud de patente internacional WO2009/033678 y la solicitud de patente europea EP2465521 describen que tanto el péptido Selank TKPRPGP y tuftsina (TKPR) son capaces de estimular la función sexual y reproductiva. Ashmarin et al, 2008, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 34(4):415-420 describe que el pentapéptido TKPRP es un metabolito conocido de
- 20 Selank, obtenido in vivo después de la escisión por carboxipeptidasa.

Kozlovskaya et al, 2001, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 35(3):121-123 presenta un estudio comparativo de un efecto de fragmentos de tuftsina en características de aprendizaje de evitación pasiva. Kozlovskaya et al, 2003, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 33(9):853-860 está relacionado también con Selank y péptidos cortos de la familia de tuftsina en la regulación del comportamiento adaptable en el estrés.

25 Descripción de la invención

El objetivo de la invención es ampliar la gama de herramientas con actividad estimulante de la función reproductiva y sexual.

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido de fórmula Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-X, en donde X es un grupo OH, OCH₃ o NH₂.

- 30 La invención más particular proporciona dicho péptido, para usar como un producto medicinal, por ejemplo para usar en la estimulación de función sexual o reproductiva, o para usar en la prevención o tratamiento de disfunción sexual o reproductiva.

La invención proporciona además un método no terapéutico para intensificar la motivación sexual, que comprende la administración de dicho péptido.

- 35 El resultado técnico, conseguido cuando se implementa la presente invención, es un aumento en la eficacia de la prevención y tratamiento de la disfunción reproductiva y sexual, reducción en la duración de terapia, y la reducción de coste de medicamentos, donde el péptido con la fórmula anterior se propone como un producto medicinal.

La presente descripción describe además varios péptidos con la fórmula general posterior A-Thr-Lys-Pro-B-C-D-X, donde:

- 40 A – 0, Met, Met (O), Thr, Ala, His, Phe, Lys, Gly

B – 0, Gly, Asp, Trp, Gln, Asn, Tyr, Pro, Arg

C – 0, Arg, Phe, Tyr, Gly, His, Pro, Lys

D – 0, Val, Gly, Tyr, Trp, Phe, His

X – OH, OCH₃, NH₂,

- 45 Donde 0 significa ningún residuo de aminoácido.

Con tal que si A ≠ 0, entonces B y/o C y/o D ≠ 0; si B ≠ 0, entonces C y/o D ≠ 0, excluyendo los péptidos Phe-Thr-Lys-Pro-Gly, Thr-Lys-Pro-Pro-Arg, Thr-Lys-Pro-Arg-Gly.

- 50 La selección de residuos de aminoácido en las posiciones A, B, C, D y X se basa en un análisis bioinformático de la frecuencia de residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de los residuos de aminoácido N-terminal y C-terminal en la base de datos [EROP-Moscow (<http://erop.inbi.ras.ru/>) Zamyatin A.A.]. La selección de estos

residuos de aminoácido se realizó en base al criterio de más de 50% de incidencia de un residuo de aminoácido en esa posición. Esta muestra de residuos de aminoácido se confirmó experimentalmente mediante la síntesis de péptidos individuales y su prueba para la estimulación de la actividad de función reproductiva y sexual en modelos *in vivo*. La posición farmacófora en un péptido se determina experimentalmente. Se sabe que cualquier péptido está expuesto a peptidasas y se rompe en fragmentos específicos. Para este propósito, los siguientes fragmentos de heptapéptido Selank se sintetizaron: Thr-Lys, Thr-Lys-Pro, Pro-Gly-Pro, Arg-Pro-Gly-Pro, Pro-Arg-Pro-Gly-Pro, y su actividad se estudió. Se proporcionan los resultados en la Tabla 3. En este análisis, se determinó el farmacóforo: es Thr-Lys-Pro. Se mostró que la unión de residuos de aminoácido individuales identificados experimentalmente al extremo C mantuvo la actividad del péptido (que estimula la función reproductiva y sexual) con tal que el número de residuos de aminoácido en el péptido es 3 o más que 4, como se muestra por estudios (Tabla 4, Ejemplo 10). Los tetrapéptidos no tienen actividad estimulante de la función reproductiva y sexual. El resultado técnico mencionado se consigue mediante síntesis dirigida de varios péptidos con la fórmula general A-Thr-Lys-Pro-B-C-D-X (excepto tetrapéptidos) y usando estos péptidos como un estimulante de la función reproductiva y sexual para la prevención y tratamiento de la disfunción reproductiva y sexual.

Nuestra propia investigación mostró que los péptidos sintetizados, es decir, tripéptido Thr-Lys-Pro, pentapéptido Thr-Lys-Pro-Arg-Pro, y hexapéptido Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Phe, que corresponden a la fórmula general A-Thr-Lys-Pro-B-C-D-X, pueden recomendarse como estimulantes de la función reproductiva y sexual.

Todos los péptidos con la fórmula general A-Thr-Lys-Pro-B-C-D-X (excepto tetrapéptidos), recomendados como estimulantes de la función reproductiva y sexual, tienen un patrón común, es decir, la molécula de tripéptido Thr-Lys-Pro está presente en su estructura molecular.

El heptapéptido Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (Selank) se usó como un control.

Los resultados de los estudios realizados mostraron que los péptidos con la fórmula general A-Thr-Lys-Pro-B-C-D-X (excepto tetrapéptidos) tienen actividad estimulante de la función reproductiva y sexual y pueden usarse como productos medicinales para la prevención y el tratamiento de la disfunción reproductiva y sexual.

25 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un diagrama de la síntesis del tetrapéptido Arg-Pro-Gly-Pro;

La Fig. 2 muestra un diagrama de la síntesis del pentapéptido Pro-Arg-Pro-Gly-Pro;

La Fig. 3 muestra un diagrama de la síntesis del tripéptido Pro-Gly-Pro;

La Fig. 4 muestra un diagrama de la síntesis del hexapéptido Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Phe;

30 La Fig. 5 muestra un diagrama de la síntesis del pentapéptido Thr-Lys-Pro-Arg-Pro;

La Fig. 6 muestra un diagrama de la síntesis del dipéptido Thr-Lys;

La Fig. 7 muestra un diagrama de la síntesis del tetrapéptido Thr-Lys-Pro-Phe;

La síntesis de péptidos con la fórmula general A-Thr-Lys-Pro-B-C-D-X se realizó mediante métodos de química peptídica en disolución que usan L-aminoácidos. La síntesis peptídica se realizó mediante la elongación en pasos de la cadena peptídica, además de la condensación del fragmento usando el método de anhídrido mixto, el método de carbodiimida con la adición de 1-hidroxibenzotriazol como un nucleófilo auxiliar, el método de éster activado, y el método de anhídrido mixto. Todos los productos intermedios y finales se aislaron y se caracterizaron. La evaporación de las disoluciones se realizó usando un evaporador al vacío a 40°C. Los puntos de fusión, determinados con el aparato de Boethius, se dan sin corrección. La identidad de los compuestos obtenidos se probó por TLC en placas recubiertas de gel de sílice Silufofol (República Checa). Las sustancias se detectaron por luz UV usando ninhidrina, reactivo de Barton, reactivo Pauly, reactivo de Reindel-Hoppe, y o-tolidina en medio de cloro. La rotación específica se determinó mediante un polarímetro AI-EPO. La homogeneidad peptídica se probó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), y la estructura peptídica se confirmó mediante métodos espectrométricos de masa. Todos los disolventes se absolutizaron de forma correspondiente. Los puntos de fusión no se corrigieron.

45 Los péptidos se obtuvieron también mediante técnicas de ingeniería genética usando células huésped diseñadas mediante cepas de laboratorio conocidas de *E. coli*, transformadas con plásmidos conocidos disponibles comercialmente que contienen ácido nucleico que codifica el péptido diana.

Los ejemplos describen síntesis peptídica.

Ejemplo de referencia 1. Síntesis del tetrapéptido Arg-Pro-Gly-Pro

50 La síntesis del tetrapéptido se realizó según el diagrama mostrado en la Figura 1. En la síntesis, se usaron el método de anhídrido mixto, el método de azida y el método de carbodiimida. Los derivados de L-aminoácidos se usaron para la síntesis. La evaporación de las disoluciones se realizó usando un evaporador de rotor a 40°C. Los puntos de fusión,

- determinados con el aparato de Boethius, se dan sin corrección. La identidad de los compuestos obtenidos se probó por TLC en placas recubiertas de gel de sílice Silufol (República Checa). Las sustancias se detectaron pulverizando la placa con una disolución de ninhidrina y (u) o-tolidina. Las sustancias se detectaron pulverizando la placa con una disolución de ninhidrina y (u) o-tolidina. Los valores de movilidad cromatográfica (Rf) en los siguientes sistemas disolventes se proporcionan: acetona: benceno: ácido acético (50:100:1) – (1); cloroformo: metanol (9:1) – (2); hexano: acetona (3:2) – (3); butanol: ácido acético: agua (4:1:1) – (4); butanol: ácido acético: piridina: agua (30:6:20:24) – (5); cloroformo: metanol: amoníaco (6:4:1) – (6); benceno: etanol (8:2) – (7); acetato de etilo: acetona: ácido acético al 50%: agua (2:1:1) – (8); cloroformo: metanol (14:1) – (9); cloroformo: metanol: amoníaco (8:1,75:0,25) – (10); cloroformo: metanol: amoníaco (6,5:3,0:0,5) – (11).
- 5
- 10 La rotación específica se determinó mediante un polarímetro AI-EPO.
- El análisis elemental usando el analizador Carlo-Erba modelo 1106.
- I. Boc-Pro-Gly-OEt. Se disolvieron 8,3 g (3,45 mmoles) de Boc-Pro-OH en 50 ml de CH₂Cl₂, se enfriaron a 5°C; después, se añadieron 38,45 mmoles (5,38 ml) de TEA. La mezcla de reacción se enfrió a -25 ÷ -30°C. A esta temperatura, se añadieron 38,45 mmoles (4,84 ml) de cloroformato de isobutilo usando una pipeta. La temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo en el intervalo de -18 ÷ -20°C durante 20 minutos. De forma simultánea, una disolución de 5,9 g (42,3 mmoles) en exceso de 1,1 veces de HCl·H-Gly-OEt en 75 ml de cloroformo, que contenía 5,92 ml de TEA. La disolución se enfrió a -25°C y, después de la formación de anhídrido mixto en el primer matraz, sus contenidos se vertieron a la disolución de éter inmediatamente. La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a -10°C y después se agitó durante 12 horas a 4°C en un agitador magnético. La mezcla de reacción se evaporó, después se añadieron 250 ml de acetato de etilo; después la disolución de acetato de etilo se lavó 3 veces con 25 ml de HCl 0,1N, 3 veces con 25 ml de H₂O, y una vez con disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se secó al vacío sobre P₂O₅/KOH y parafina.
- 15
- 20
- Rendimiento: 10,2 g (30,3 mmoles) 78,83%
- Rf – 0,5 (7); 0,862 (8)
- 25 Punto de fusión 68-70°C.
- II. Boc-Pro-Gly-N₂H₃. Se disolvieron 10,2 g de Boc-Pro-Gly-OEt (30,3 mmoles) en 80 ml de metanol absoluto, y se añadió un exceso de 4 veces de hidrato de hidracina, viz. 5,88 ml (121,2 mmoles). La disolución se agitó durante 12 horas en un agitador magnético a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó, después se evaporó dos veces con éter; después se vertió éter (~5 ml) sobre el residuo y se dejó en un refrigerador toda la noche (para mejor cristalización, se añadió agente de siembra). Los cristales precipitados se filtraron, se lavaron con éter usando un filtro y se secaron en un desecador.
- 30
- Rendimiento: 6,9 g (20,79 mmoles) 68,62%
- Rf - 0,284 (7); 0,474 (8); 0,189 (9)
- Punto de fusión 98-100°C
- 35 III. Boc-Pro-Gly-Pro-OBzl. Se añadieron 58,4 mmoles (exceso de 4 veces) de cloruro de hidrógeno en acetato de etilo a la disolución de Boc-Pro-Gly-N₂H₃, que contenía 4,7 g (14,6 mmoles) en 40 ml de DMF, se enfriaron a -20°C, e, inmediatamente, 1,73 mL (14,6 mmoles) de nitrito de terc-butilo recién destilado; después, la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a -5°C. La mezcla de reacción se enfrió a -40°C, y se añadió disolución de 8,2 mL (58,4 mmoles) de TEA en 4 mL de DMF, enfriado a -10°C; cuando la temperatura de la mezcla de reacción había subido a -20°C, se añadieron 3,7 g (15,3 mmoles) de un exceso de 1,05 veces de HCl·H-Pro-OBzl a 20 ml de DMF y 2,14 ml de TEA. Después, se agitó a 4°C durante 24 horas en un agitador magnético. La mezcla de reacción se evaporó, y el residuo se disolvió en 200 mL de acetato de etilo y se lavó 2 veces con 20 ml de H₂O, 3 veces con 20 ml de KHSO₄ sódico al 10%, 3 veces con 20 ml de H₂O, 3 veces con 20 ml de NaHCO₃ al 5%, y 3 veces con 20 ml de H₂O. Se secó la disolución de acetato de etilo sobre MgSO₄. Después se evaporó, y una pequeña cantidad de éter (~10 mL) se añadió al residuo. Después, se dejó en un refrigerador para la cristalización. Para mejor cristalización del producto, se añadió agente de siembra. Los cristales precipitados se filtraron y se lavaron con una pequeña cantidad de éter usando un filtro. Después, se secaron en un desecador.
- 40
- 45
- Rendimiento: 5,358 g (11,65 mmoles) 79,92%
- Rf – 0,326 (7); 0,947 (8); 0,390 (9)
- 50 Punto de fusión 125-126°C.
- [α]_D²² = -101,18° (c = 0,85; CH₃OH).
- Análisis elemental: C 62,89 (62,73); N 9,21 (9,14); H 7,52 (7,24).

IV. TFA·H-Pro-Gly-Pro-OBzl. Se disolvieron 5,358 g (11,65 mmoles) de Boc-Pro-Gly-Pro-OBzl en 29,13 ml de cloruro de metileno; después, se añadieron 29,13 mL de TFA, se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente, se evaporaron 2 veces con etanol absoluto, 2 veces con benceno, 2 veces con éter y se disolvieron en benceno; después, se vertió hexano encima. El hexano se decantó, y la sustancia resultante se secó al vacío en un desecador sobre KOH, P₂O₅ y parafina, mientras el desecante se cambió varias veces.

Rendimiento: 4,63 g (9,7 mmoles) 98%

Rf – 0,043 (7); 0,247 (8); 0,018 (9).

V. Boc-Arg(NO₂)-Pro-Gly-Pro-OBzl. Se disolvieron 3,09 g de Boc-Arg (NO₂)-OH (9,7 mmoles) en 50 mL de THF y 10 ml de DMF, se añadieron 2,07 g (10,67 mmoles) de DCC, se enfriaron a 0°C, se agitaron durante 40 minutos; después se añadió una disolución de TFA·H-Pro-Gly-Pro-OBzl a 50 ml de THF y 4,46 ml (9,7 mmoles de TEA). La mezcla de reacción se agitó durante tres días. El precipitado de DCM se filtró; la disolución se evaporó al vacío; después, se añadieron 200 ml de hexano al residuo. Con esto, el producto deseado se separó como un aceite, que se disolvió en 500 mL de acetato de etilo y se lavó 3 veces con 25 ml de HCl 0,1N, tres veces con 25 ml de H₂O, y una vez con disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se precipitó con éter seco. El precipitado se filtró y se secó al vacío sobre P₂O₅/KOH y parafina, mientras que el desecante se cambió varias veces.

Rendimiento: 4,76 g (7,9 mmoles) 85%

Rf – 0,44 (1); 0,8 (11)

Punto de fusión 108-110°C

[α]_D²² = -77,8° (c=0,5; CH₃COOH).

VI. Boc-Arg-Pro-Gly-Pro. Se disolvieron 4,76 g (6,5 mmoles) de Boc-Arg(NO₂)-Pro-Gly-Pro-OBzl en 100 ml de metanol; después se añadieron 1 ml de ácido clorhídrico 1N y 4,67 g de catalizador, viz. óxido de paladio al 10% en óxido de aluminio neutro, y se realizó la hidrogenación en la corriente de hidrógeno seco a temperatura ambiente a 1 atm durante 6 horas. Después, el catalizador se filtró y se lavó en el filtro con metanol. El filtrado acumulado se evaporó hasta sequedad. El residuo se precipitó con éter desde metanol absoluto. Después, se secó al vacío, mientras el desecante se cambió varias veces.

Rendimiento: 4,23 g (5,8 mmoles) 89%

Rf – 0,125 (4); 0,57 (6); 0,37 (5)

Punto de fusión 123-125°C

VII. Arg-Pro-Gly-Pro. Se suspendieron 4,23 g (5,8 mmoles) de Boc-Arg-Pro-Gly-Pro-OH en 10 ml de ácido clorhídrico 2N en dioxano y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min. Después, se añadió éter seco, y el precipitado se lavó por decantación con éter seco. Se precipitó de nuevo con éter desde metanol absoluto. El precipitado resultante se disolvió en 7,5 ml de etanol al 30% y se aplicó a la columna Amberlyst A-21 (forma AcO⁻) para el intercambio de sal de acetato/hidrocloreuro. El péptido se eluyó con 200 ml de etanol al 30%, se evaporó hasta sequedad al vacío y se precipitó con éter absoluto desde metanol.

Rendimiento: 3,69 g (4,93 mmoles) 85%

Rf – 0,287 (4); 0,145 (5); 0,338 (14)

Punto de fusión 120-122°C

Resultados de HPLC: Columna: Supercosil ABZ Plus, tamaño 4,6x250 mm; caudal de 1 mL/min; Eluyente A: NH₄H₂PO₄ + H₃PO₄ (50 mM, pH 2,8); eluyente B: MeOH.

Gradiente: 0-20 min (0-40% de B); tiempo de retención 21,21 min.

Rf – 0,24 (6)

Punto de fusión = 151°C

[α]_D²² = -65,0° (c=0,5 CH₃COOH)

Resultados de HPLC: Columna: Zorbax ODS d= 4,6 mm, t=35°C

Caudal de 1 mL/min; A= NH₄H₂PO₄ 50 mM (pH 2,5); B=A + MeOH (1:1); 10-60% de B (en 25 min).

Tiempo de retención 16,5 min.

Ejemplo de referencia 2. Síntesis de pentapéptido Pro-Arg-Pro-Gly-Pro.

La síntesis peptídica se realizó por métodos clásicos de química peptídica usando L-aminoácidos naturales según el diagrama mostrado en la Figura 2.

5 Primero, se produjo el tripéptido Pro-Gly-Pro; después, el pentapéptido se obtuvo mediante el desarrollo en pasos de la cadena peptídica desde el extremo N. En síntesis, se usaron el método de anhídrido mixto, el método de azida y el método de carbodiimida.

10 Se proporcionan los valores de movilidad cromatográfica (Rf) en los siguientes sistemas disolventes: butanol: ácido acético: agua (4:1:1)-(1); cloroformo: metanol: amoníaco (6:4:1)-(2); acetona: benceno: ácido acético (50:100:1)-(3); cloroformo: metanol (9:1)-(4); hexano: acetona (3:2)-(5); butanol: ácido acético: piridina: agua (30:6:20:24)-(6); cloroformo: metanol (14:1)-(7).

15 I. Boc-Pro-Gly-OEt. Se disolvieron 8,3 g de Boc-Pro (38,45 mmoles) en 50 ml de CH_2Cl_2 , se enfriaron a $+5^\circ\text{C}$, y se añadieron 38,45 mmoles (5,38 ml) de TEA. La mezcla de reacción se enfrió a $-25 \div -30^\circ\text{C}$. A esta temperatura, se añadieron 38,45 mmoles (4,84 ml) de cloroforniato de isobutilo usando una pipeta. La temperatura de mezcla de reacción se mantuvo en el intervalo de $-18 \div -20^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. De forma simultánea, una disolución de 5,9 g (42,3 mmoles) en exceso de 1,1 veces de HCl·H-Gly-OEt en 75 ml de cloroformo, que contenía 5,92 ml de TEA. La disolución se enfrió a -25°C y, después de la formación de anhídrido mixto en el primer matraz, sus contenidos se vertieron a la disolución de éter inmediatamente. La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a -10°C y después se agitó durante 12 horas a 4°C en un agitador magnético. La mezcla de reacción se evaporó y se añadieron 250 ml de acetato de etilo a ella; la disolución de acetato de etilo se lavó 3 veces con 25 ml de HCl 0,1N, 3 veces con 25 ml de H_2O , y una vez con disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó. El residuo se secó al vacío sobre $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$ y parafina.

20 Rendimiento: 10,2 g (30,3 mmoles) 78,83%

Rf – 0,5 (3); 0,862 (4).

25 II. Boc-Pro-Gly- N_2H_3 . Se disolvieron 10,2 g de Boc-Pro-Gly-OEt (30,3 mmoles) en 80 ml de metanol absoluto, y se añadió un exceso de 4 veces de hidrato de hidracina, viz. 5,88 ml (121,2 mmoles). La disolución se agitó durante 12 horas en un agitador magnético a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó, después se evaporó dos veces con éter; después, se vertió éter (~5 ml) sobre el residuo y se dejó en un refrigerador toda la noche (para mejor cristalización, se añadió el agente de siembra). Los cristales precipitados se filtraron, se lavaron con éter usando un filtro y se secaron en un desecador.

30 Rendimiento: 6,9 g (20,79 mmoles) 68,62%

Punto de fusión $98-100^\circ\text{C}$

Rf – 0,284 (3); 0,474 (4); 0,189 (5).

35 III. Boc-Pro-Gly-Pro-OBzl. Se añadieron 58,4 mmoles (exceso de 4 veces) de cloruro de hidrógeno en acetato de etilo a la disolución de Boc-Pro-Gly- N_2H_3 , que contenía 4,7 g (14,6 mmoles) en 40 ml de DMF, se enfriaron a -20°C , e, inmediatamente, 1,73 mL (14,6 mmoles) de nitrito de terc-butilo recién destilado; después, la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a -5°C . La mezcla de reacción se enfrió a -40°C , y se añadió la disolución de 8,2 mL (58,4 mmoles) de TEA en 4 mL de DMF, enfiada a -10°C ; cuando la temperatura de la mezcla de reacción ha subido a -20°C , se añadieron 3,7 g (15,3 mmoles) de exceso de 1,05 veces de HCl·H-Pro-OBzl a 20 ml de DMF y 2,14 ml de TEA. Después, se agitó a 4°C durante 24 horas en un agitador magnético. La mezcla de reacción se evaporó, y el residuo se disolvió en 200 mL de acetato de etilo y se lavó 2 veces con 20 ml de H_2O , 3 veces con 20 ml de KHSO_4 sódico al 10%, 3 veces con 20 ml de H_2O , 3 veces con 20 ml de NaHCO_3 al 5%, y 3 veces con 3 ml de H_2O . La disolución de acetato de etilo se secó sobre MgSO_4 . Después se evaporó, y una pequeña cantidad de éter (~10 mL) se añadió al residuo. Después, se dejó en un refrigerador. Para mejor cristalización del producto, se añadió agente de sembrado. Los cristales precipitados se filtraron y se lavaron con una pequeña cantidad de éter usando un filtro.

45 Después, se secaron en un desecador.

Rendimiento: 5,358 g (11,65 mmoles) 79,92%

Rf – 0,326 (3); 0,947 (4); 0,390 (5)

Punto de fusión $125-126^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{22} = -101,2^\circ$ (c=0,85; CH_3OH)

50 Análisis elemental: C 62,89 (62,73); N 9,21 (9,14); H 7,52 (7,24).

IV. TFA·H-Pro-Gly-Pro-OBzl. Se disolvieron 5,358 g (11,65 mmoles) de Boc-Pro-Gly-Pro-OBzl en 29,13 ml de cloruro de metileno; se añadieron 29,13 mL de TFA, se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente, se evaporaron

2 veces con etanol absoluto, 2 veces con benceno, 2 veces con éter y se disolvieron en benceno; después, se vertió hexano. Se decantó el hexano, y la sustancia resultante se secó al vacío en un desecador sobre P_2O_5/KOH y parafina.

Rendimiento: 4,63 g (9,7 mmoles) 98%

Rf – 0,043 (3); 0,247 (4); 0,018 (5).

- 5 V. Boc-Arg(NO_2)-Pro-Gly-Pro-OBzl. Se disolvieron 3,09 g (9,7 mmoles) de Boc-Arg (NO_2) en 50 ml de THF y 10 ml de DMF; después, se añadieron 2,07 g (10,67 mmoles) de DCC, se enfriaron a $0^\circ C$ y se agitaron durante 40 minutos; se añadió una disolución de TFA-H-Pro-Gly-Pro-OBzl a 50 ml de THF y 4,46 ml (9,7 mmoles) de TEA. La mezcla de reacción se agitó durante tres días. El precipitado de DCM se filtró; la disolución se evaporó al vacío; después, se añadieron 200 ml de hexano al residuo. Con esto, el producto deseado se separó como un aceite, que se disolvió en 100 mL de acetato de etilo y se lavó 3 veces con 25 ml de HCl 0,1N, tres veces con ml de H_2O , y una vez con disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se evaporó. El residuo se secó al vacío sobre P_2O_5/KOH y parafina.

Rendimiento: 4,76 g (7,9 mmoles) 85%

Rf – 0,44 (1); 0,8 (6)

- 15 Punto de fusión $108-110^\circ C$.

- VI. TFA-Arg(NO_2)-Pro-Gly-Pro-OBzl. Se disolvieron 4,76 g (7,9 mmoles) de Boc-Arg(NO_2)-Pro-Gly-Pro-OBzl en 20 ml de cloruro de metileno, se añadieron 20 mL de TFA, se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente, se evaporaron 2 veces con etanol absoluto, 2 veces con benceno, 2 veces con éter, después se disolvieron en benceno; después, se vertió hexano. Se decantó el hexano, y la sustancia resultante se secó al vacío en un desecador sobre P_2O_5/KOH y parafina.

El rendimiento es cuantitativo.

Rf – 0,16 (1); 0,27 (6).

- 25 VII. Boc-Pro-Arg(NO_2)-Pro-Gly-Pro-OBzl. Se disolvieron 1,7 g (7,9 mmoles) de Boc-Pro en 20 mL de TFH, y se añadieron 1,07 g (7,9 mmoles) de BT, se enfriaron a $0^\circ C$; se añadieron 1,8 g de DCC en 50 ml de THF. En 40 min, se añadieron una disolución de TFA-Arg(NO_2)-Pro-Gly-Pro-OBzl (7,9 mmoles) en 50 mL de THF y 1,1 mL (7,9 mmoles) de TEA a la mezcla de reacción. Se agitó durante 2 horas a $0^\circ C$ y durante 2 días a temperatura ambiente; después, se filtró el DCM, se evaporó al vacío, se disolvió en 500 mL de acetato de etilo y se trató de forma similar a Boc-Pro-Arg(NO_2)-Pro-Gly-Pro-OBzl.

Rendimiento: 4,07 g (67,8%)

- 30 Rf – 0,42 (1); 0,72 (6); 0,31 (7)

Punto de fusión $147-148^\circ C$.

- 35 VIII. Boc-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro. Se disolvieron 4,07 g (6,5 mmoles) en 100 ml de metanol; se añadieron 1 ml de ácido clorhídrico 1N y 0,85 g de catalizador, viz. óxido de paladio al 10% en óxido de aluminio neutro, y la hidrogenación en la corriente de hidrógeno seco a temperatura ambiente a 1 atm se realizó durante 6 horas. Después, el catalizador se filtró y se lavó en el filtro con metanol. El filtrado acumulado se evaporó hasta sequedad. El residuo se precipitó con éter desde el metanol absoluto.

Rendimiento: 3,02 g (5,8 mmoles) 89%

Rf – 0,125 (1), 0,57 (2), 0,37 (6).

- 40 IX. Pro-Arg-Pro-Gly-Pro. Se suspendieron 3,02 g (5,8 mmoles) de Boc-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro en 10 ml de ácido clorhídrico 2N en dioxano y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después, se añadió éter seco, y el precipitado se lavó por decantación con éter seco. Se precipitó de nuevo con éter desde metanol absoluto. El precipitado resultante se disolvió en 7,5 ml de etanol al 30% y se aplicó a la columna Amberlyst A-21 (forma AcO^-) para el intercambio de sal de acetato/hidrocloruro. El péptido se eluyó con 200 ml de etanol al 30%, se evaporó hasta sequedad al vacío y se precipitó con éter absoluto desde metanol.

- 45 Rendimiento: 2,27 g (75%)

Rf - 0,2 (2); 0,1 (6)

Punto de fusión $180-185^\circ C$

$[\alpha]_D^{20} = -105^\circ$ (c=0,4; CH_3COOH).

Composición de aminoácidos frente a la arginina: Pro 2,78 (3); Gly 1,1 (1)

Resultados de HPLC: Columna: Supercosil ABZ Plus, tamaño 4,6x250 mm; caudal 1 mL/min; Eluyente A: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + H_3PO_4 (50 mM, pH 2,8); eluyente B: MeOH

Gradiente: 0-20 min (0-40% de B); tiempo de retención 10,13 min.

5 Ejemplo de referencia 3. Síntesis de tripéptido Pro-Gly-Pro.

La síntesis del tripéptido Pro-Gly-Pro se realizó según el diagrama mostrado en la Figura 3. La síntesis del tripéptido Pro-Gly-Pro se realizó usando modernos grupos protectores y métodos de formación de enlace peptídico en disolución. El método de anhídrido mixto con PivCl se usó para la formación de enlace peptídico. Se usó la protección con terc-butiloxicarbonilo (Boc) para la protección de grupos amino, y se reclutó éster de bencilo (OBzl) para la protección del grupo carboxilo. Se usó el enfoque en etapas para la elongación de la cadena peptídica.

Se usaron derivados de L-aminoácidos para la síntesis. La evaporación de disoluciones se realizó usando un evaporador al vacío a 40°C. Los puntos de fusión, determinados con el aparato de Boethius, se dan sin corrección.

La identidad de los compuestos obtenidos se probó por TLC en placas recubiertas con gel de sílice Silufol (República Checa). Las sustancias se detectaron pulverizando la placa con una disolución de ninhidrina y (u) o-tolidina. Se proporcionan los valores de movilidad cromatográfica (Rf) en los siguientes sistemas disolventes: (acetato de etilo: acetona: ácido acético al 50%: agua (2:1:1); benceno: etanol (8:2); cloroformo: metanol (6:4:1); cloroformo: metanol: ácido acético (42:7:1); acetona: benceno: ácido acético (50:100:1); cloroformo: metanol (9:1); hexano: acetona (3:2); butanol: ácido acético: agua (4:1:1); butanol: ácido acético: piridina: agua (30:6:20:24); hexano: acetato de etilo (4:1); cloroformo: metanol: amoniaco (8:1,75:0,25); (isopropanol: ácido fórmico: agua) (20:5:1); (cloroformo: metanol: amoniaco) (7:2,5:0,5); metanol. La rotación específica se determinó mediante polarímetro Al-EPO). Análisis elemental usando el analizador Carlo-Erba modelo 1106.

I. Producción de Boc-Pro-Gly-OH.

1. Se disolvieron 10,75 g (50 mmoles) de Boc-Pro en 150 ml de acetonitrilo, se enfriaron a -5°C; después se añadieron 7,7 ml (50 mmoles) de trietilamina (TEA) a la disolución, y se enfrió a -20°C, mientras se agitaba en un agitador magnético. Se añadieron 6,8 ml (55 mmoles) de cloruro de pivaloilo (PivCl) a la disolución enfriada, se agitó en un agitador magnético durante 20 minutos a -10°C y después se enfrió a -30°C; después, se añadió la disolución pre-enfriada de Gly. Simultáneamente, se preparó la disolución de Gly.

2. Se disolvieron 4,5 g de Gly (60 mmoles, exceso de 1,2 veces) en 35 ml de agua y 60 ml de acetonitrilo, se añadieron 8,4 ml (60 mmoles) de trietilamina. La mezcla se enfrió a -10°C y se añadió a la disolución en el primer matraz después de 20 minutos. La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a -10°C y se agitó durante 2 horas a 18-20°C en un agitador magnético. La mezcla de reacción se evaporó en un evaporador rotatorio. Aproximadamente 50 mL de agua se añadieron al residuo. La disolución acuosa se aciduló con un exceso de 3 veces de NaHSO_4 (24,84 g) a pH = 3 y se extrajo 5 veces con 100 ml de acetato de etilo. La disolución de acetato de etilo acumulada se lavó con H_2O (50 mL), disolución al 10% de KHSO_4 (50 mL), H_2O (50 mL), y NaCl saturado (50 mL). La disolución de acetato de etilo se secó sobre MgSO_4 . El acetato de etilo seco se filtró y se evaporó. El éter seco se añadió al residuo. Tras la adición de éter al matraz, se precipitó el producto, que se filtró y se lavó con éter seco usando un filtro. La sustancia resultante se secó al vacío en un desecador sobre KOH , P_2O_5 y parafina, mientras el desecante se cambiaba varias veces.

P.M. del producto 272,3

Rendimiento: 5,97 g (21,74 mmoles); (43,5%)

40 Punto de fusión 70°C

Rf – 0,863 (acetona-benceno-ácido acético) (50:100:1);

0,746 (benceno-etanol) (8:2); 0,903 (cloroformo: metanol) (9:1);

0,847 (acetato de etilo: acetona: ácido acético al 50%: agua) (2:1:1).

II. Producción de Boc-Pro-Gly-Pro-OBzl.

45 1. Se disolvieron 5,97 g (21,74 mmoles) de Boc-Pro-Gly-OH en 100 ml de acetonitrilo, se enfriaron a -5°C; después se añadió un exceso de 1,1 veces (3,35 ml, 23,9 mmoles) de trietilamina (TEA) a la disolución, y se enfrió a -20°C, mientras se agitaba en un agitador magnético. Se añadió un exceso de 1,1 veces (2,34 ml, 23,9 mmoles) de cloruro de pivaloilo (PivCl) a la disolución enfriada, se agitó en un agitador magnético durante 20 minutos a -10°C y después se enfrió a -30°C; después se añadió disolución pre-enfriada de HCl-Pro-OBzl . Simultáneamente, se preparó HCl-Pro-OBzl .

2. Se disolvieron 6,3 g de HCl-Pro-OBzl (26,1 mmoles, exceso de 1,2) en 50 ml de acetonitrilo, se añadieron 4,0 ml (28,71 mmoles; exceso de 1,1 veces) de trietilamina. La mezcla se enfrió a -10°C y se añadió a la disolución en el primer matraz después de 20 minutos. La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a -10°C y se agitó durante 2 horas a $18-20^{\circ}\text{C}$ en un agitador magnético. La mezcla de reacción se evaporó. Se añadieron 300 ml de acetato de etilo al residuo evaporado. La disolución de acetato de etilo se lavó con H_2O (3 veces con 25 mL), disolución al 10% de KHSO_4 (3 veces con 25 ml), H_2O (3 veces con 25 ml), NaHCO_3 al 5% (3 veces con 25 ml), H_2O (3 veces 25 mL), y disolución saturada de NaCl (una vez con 25 mL). La disolución de acetato de etilo se secó sobre MgSO_4 . El acetato de etilo seco se filtró y se evaporó. Aproximadamente 100 ml de éter seco se añadieron al residuo. Tras la adición de éter al matraz, se precipitó el producto, que se filtró y se lavó con éter seco usando un filtro. La sustancia resultante se secó al vacío en un desecador sobre KOH, P_2O_5 y parafina, mientras el desecante se cambiaba varias veces.

P.M. del producto 459,82

Rendimiento: 8,12 g (17,66 mmoles); (81,23%)

Punto de fusión $125-126^{\circ}\text{C}$

Rf – 0,326 (acetona: benceno: ácido acético) (50:100:1)

15 0,390 (hexano: acetona) (3:2)

0,947 (cloroformo: metanol) (9:1)

0,716 (metanol)

0,620 (benceno: etanol) (8:2)

III. Producción de Boc-Pro-Gly-Pro-OH

20 Se disolvieron 8 g (17,4 mmoles) de Boc-Pro-Gly-Pro-OBzl en 100 ml de metanol, se añadieron 0,5 ml de CH_3COOH y negro de paladio, mientras se agitaba en un agitador magnético, y se pasó hidrógeno durante 2 horas. La disolución se filtró, se evaporó, se evaporó 3 veces con benceno y 2 veces con acetato de etilo. Después, se precipitó con éter hexano desde acetona, y el precipitado formado en el matraz se secó en un desecador sobre $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$ y parafina.

P.M. del producto 369,39

25 Rendimiento: 6,3 g (17,05 mmoles) 98%

Punto de fusión $99-100^{\circ}\text{C}$

Rf: 0,560 (cloroformo-metanol) (9:1)

0,812 (cloroformo-metanol-ácido acético) (42:7:1)

0,187 (acetona: benceno: ácido acético) (50:100:1)

30 0,164 (hexano: acetona) (3:2)

IV. Producción de Pro-Gly-Pro

Se añadieron 40,6 ml de cloruro de metileno y 40,6 ml de TFA a 6,0 g (16,24 mmoles) de Boc-Pro-Gly-Pro-OH y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente; después de la eliminación del grupo protector, la disolución se evaporó 2 veces con metanol absoluto, 2 veces con benceno y 2 veces con éter. Se precipitó con éter desde acetona. El residuo se secó al vacío sobre P_2O_5 , KOH y parafina. El producto seco se precipitó de nuevo con dietiléter seco desde MeOH absoluto.

P.M. del producto 381,39

Rendimiento: 5,6 g (14,72 mmoles) (90,62%)

40 El precipitado resultante de TFA-Pro-Gly-Pro-OH se disolvió en 10 ml de etanol al 30%; después, se añadieron 25 mL de resina de intercambio iónico Amberlyst A-21 (CH_3COO^-) para el intercambio de sal de trifluoroacetato a acetato y se agitó en un agitador magnético durante 45 minutos; después, se lavó con 150 ml de etanol al 30%, se evaporó hasta sequedad al vacío y se precipitó con dietiléter seco desde metanol absoluto. El precipitado resultante se filtró y se secó en un desecador al vacío sobre P_2O_5 , KOH y parafina, mientras el desecante se cambiaba varias veces.

P.M. del producto 328,34

45 Rendimiento: 4,54 g (13,84 mmoles) (94%)

Punto de fusión 143-145°C

$[\alpha]_D^{22}$ -31,5° (c 1, MeOH)

Rf: 0,59 (cloroformo: metanol: amoniac) (6:4:1)

0,52 (cloroformo: metanol: amoniac) (4:4,5:1,5)

5 0,524 (etanol: amoniac) (7:3)

Ejemplo de referencia 4. Síntesis del hexapéptido Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Phe.

La síntesis del hexapéptido de Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Phe se realizó según el diagrama mostrado en la Figura 4.

10 La síntesis del hexapéptido Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Phe se realizó usando modernos grupos protectores y métodos de formación de enlace peptídico en disolución. El método de sal de TBA, el método de éster activado, el método de carbodiimida y el método de anhídrido mixto se usaron para la formación de enlace peptídico. Se usaron los enfoques de por pasos y en bloques.

Ejemplo 5. Síntesis del pentapéptido Thr-Lys-Pro-Arg-Pro.

La síntesis del pentapéptido Thr-Lys-Pro-Arg-Pro se realizó según el diagrama mostrado en la Figura 5.

15 La síntesis del pentapéptido Thr-Lys-Pro-Arg-Pro se realizó usando modernos grupos protectores y métodos de formación de enlace peptídico en disolución. Se usaron el método de sal de TBA, el método de éster activado y el método de carbodiimida para la formación de enlace peptídico. Se usaron los enfoques tanto por pasos como en bloques.

Ejemplo de referencia 6. Síntesis del dipéptido Thr-Lys

La síntesis del dipéptido Thr-Lys se realizó según el diagrama mostrado en la Figura 6.

20 La síntesis del dipéptido Thr-Lys se realizó usando grupos protectores modernos y métodos de formación de enlace peptídico en disolución. Se usó el método de sal de TBA para la formación de enlace peptídico.

25 Los derivados de L-aminoácidos tanto protegidos como libres se usaron para la síntesis de los péptidos descritos en los ejemplos 7-9. Los disolventes usados en la síntesis peptídica, se absolutizaron correspondientemente. La homogeneidad peptídica se probó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) usando el sistema cromatográfico líquido de microcolumna Millichrome A-02. Los péptidos sintetizados se caracterizaron por espectrometría de masas usando el espectrómetro de masas Bruker (@Bruker Daltonik GmbH).

Ejemplo de referencia 7. Síntesis del tetrapéptido Thr-Lys-Pro-Phe.

La síntesis del tetrapéptido Thr-Lys-Pro-Phe se realizó según el diagrama mostrado en la Figura 7.

30 La síntesis del tetrapéptido Thr-Lys-Pro-Phe se realizó usando modernos grupos protectores y métodos de formación de enlace peptídico en disolución. El método de sal de TBA y el método de éster activado se usaron para la formación de enlace peptídico. Se usó el enfoque por pasos para el alargamiento de la cadena peptídica.

35 Se usaron derivados de L-aminoácidos tanto protegidos como libres para la síntesis. La evaporación de las disoluciones se realizó usando el evaporador al vacío a 40°C. Los puntos de fusión, determinados con el aparato de Boethius, se dan sin corrección. La identidad de los compuestos obtenidos se probó por TLC en placas recubiertas con gel de sílice Silufol (República Checa). Las sustancias se detectaron pulverizando la placa con una disolución de ninhidrina y (u) o-tolidina. Se proporcionan los valores de movilidad cromatográfica (Rf) en los siguientes sistemas disolventes: (butanol: ácido acético: agua) (4:1:1); (benceno: etanol) (8:2); (cloroformo: metanol) (9:1); (isopropanol: ácido fórmico: agua) (20:5:1); (cloroformo-metanol-ácido acético) (42:7:1); (cloroformo: metanol: amoniac) (8:1,75:0,25); (acetona-benceno-ácido acético) (50:100:1); (cloroformo: metanol: amoniac) (6:4:1); (cloroformo: metanol: amoniac) (44,5:1,5); (butanol: ácido acético: piridina: agua) (30:6:20:24).

I. Producción de Z-Lys(Boc)-Pro-OH.

45 Se añadió disolución de TBA al 13% (98 ml) a 46,32 mmoles (5,34 g) de Pro y se evaporó dos veces con etanol, dos veces con mezcla de etanol/benceno, y 2 veces con benceno. Se añadieron 300 ml de acetato de etilo absoluto; la mezcla de reacción se enfrió a 0°C, y se añadieron 23,16 mmoles (12,66 g) de Z-Lys (Boc)-OPfp sintetizado anteriormente y se agitaron en un agitador magnético durante 1 hora. La masa de reacción se evaporó, y se añadieron 40 ml de agua al residuo de evaporación. La disolución acuosa se lavó 3 veces con 80 ml de éter. Después de lavar con éter, la disolución acuosa se aciduló con ácido cítrico a pH 3. Después de la acidulación, la disolución acuosa se extrajo con acetato de etilo 3 veces en alícuotas de 40 ml. El acetato de etilo acumulado después de la extracción se lavó 3 veces con 20 ml de agua, 3 veces con 20 ml de disolución al 10% de KHSO₄, y 3 veces con 20 ml de agua. La

disolución de acetato de etilo se secó sobre MgSO_4 . Después, se filtró y se evaporó en un evaporador rotatorio. La sustancia resultante se precipitó con hexano desde acetato de etilo. El hexano se decantó, y la sustancia resultante se secó al vacío en un desecador sobre KOH , P_2O_5 y parafina, cambiando repetidamente el desecante.

Rendimiento: 9,68 g (20,26 mmoles); (87,51%).

5 Punto de fusión 76-77°C

Rf – 0,705 (butano: ácido acético: agua) (4:1:1);

0,560 (benceno-etanol) (8:2);

0,476 (cloroformo: metanol) (9:1);

0,813 (isopropanol: ácido fórmico: agua) (20:5:1);

10 0,297 (acetona-benceno-ácido acético) (50:100:1).

I. Producción de H-Lys(Boc)-Pro-OH.

Se añadieron 300 ml de metanol absoluto, 2 ml de ácido acético y negro de paladio a 9,68 g (20,26 mmoles) de Z-Lys(Boc)-Pro-OH, y se realizó la hidrogenación en la corriente de hidrógeno seco a temperatura ambiente a 1 atm durante 8 horas. Después, el catalizador se filtró y se lavó en el filtro con metanol. El filtrado acumulado se evaporó hasta sequedad. El residuo se precipitó con éter desde metanol absoluto. Después, se secó al vacío, mientras el desecante se cambiaba varias veces.

15

Rendimiento: 6,38 g (18,58 mmoles); (91,87%)

Punto de fusión 98-99°C

Rf – 0,110 (cloroformo-metanol-ácido acético) (42:7:1);

20 0,166 (butanol: ácido acético: agua) (4:1:1);

0,235 (cloroformo: metanol: amoníaco) (8:1,75:0,25);

0,494 (isopropanol: ácido fórmico: agua) (20:5:1) (2:1:1)

III. Producción de Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-OH.

Se añadió disolución al 13% de TBA (39,4 ml) a 18,58 mmoles (6,38 g) de Lys (Boc)-Pro-OH y se evaporó 2 veces con etanol, 2 veces con mezcla de etanol/benceno y 2 veces con benceno. Se añadieron 250 ml de acetato de etilo absoluto; la mezcla de reacción se enfrió a 0°C, y se añadieron 9,2 mmoles (3,74 g) de Boc-Thr-OPfp sintetizado anteriormente y se agitó en un agitador magnético durante 1 hora. La masa de reacción se evaporó, y se añadieron 40 ml de agua al residuo de evaporación. La disolución acuosa se lavó 3 veces con 80 ml de éter. Después de lavar con éter, la disolución acuosa se aciduló con 18,58 mmoles (3,95 g) de ácido cítrico a pH 3. Después de la acidulación, se extrajo la disolución acuosa con acetato de etilo 3 veces en alícuotas de 40 ml. El acetato de etilo acumulado después de la extracción se lavó 3 veces con 20 ml de agua, 3 veces con 20 ml de disolución al 10% de KHSO_4 , y 3 veces con 20 ml de agua. La disolución de acetato de etilo se secó sobre MgSO_4 .

30

Después, se filtró y se evaporó en un evaporador rotatorio. La sustancia resultante se precipitó con hexano desde acetato de etilo. El hexano se decantó, y la sustancia resultante se secó al vacío en un desecador sobre KOH , P_2O_5 y parafina, mientras el desecante se cambiaba varias veces.

35

Rendimiento: 3,32 g (6,1 mmoles); (66,26%)

Punto de fusión 105-107°C

Rf – 0,297 (acetona-benceno-ácido acético) (50:100:1);

0,234 (cloroformo: metanol) (9:1); 0,560 (benceno-etanol) (8:2).

40 IV. Producción de Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Phe-OH.

1. Producción de Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-OSu

Se añadieron 3,53 mmoles (0,38 g) de hidroxisuccinimida a 1,66 g (3,05 mmoles) de Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro en 50 ml de acetato de etilo absoluto, y la disolución resultante se enfrió a 0°C, mientras se agitaba en un agitador magnético; después, se añadieron 0,76 g (3,53 mmoles) de DCC (diclohexilcarbodiimida) y se agitaron en un agitador magnético a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de pararse la reacción, la mezcla de reacción resultante se filtró y

45

5 el precipitado se desechó. Se añadieron 200 ml de acetato de etilo absoluto a la disolución resultante. El acetato de etilo acumulado se lavó 2 veces con 20 ml de disolución saturada de NaCl, dos veces con 20 ml de KHSO₄ sódico al 10%, 2 veces con 20 ml de disolución saturada de NaCl, 2 veces con 20 ml de NaHCO₃ al 5%, y 2 veces con 20 ml de disolución saturada de NaCl. La disolución de acetato de etilo se secó sobre MgSO₄. Después, se filtró y se evaporó en un evaporador rotatorio. La sustancia resultante se precipitó con éter y hexano desde acetato de etilo. El precipitado se filtró y se secó al vacío sobre KOH, P₂O₅ y parafina, mientras el desecante se cambiaba varias veces.

Rendimiento: 1,52 g (2,37 mmoles) 77,74%

Rf – 0,560 (benceno-etanol) (8:2); 0,457 (cloroformo: metanol) (9:1).

10 2. Después de la preparación, se disolvieron 1,52 g (2,37 mmoles) de Boc-Thr-Lys (Boc)-Pro-OSu en 25 ml de dimetilformamida y se añadieron a la disolución preparada, que contenía 0,392 g (2,37 mmoles) de L-Phe en 25 ml de dimetilformamida. La disolución se agitó en un agitador magnético a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó en un evaporador rotatorio y se precipitó con éter desde benceno. El precipitado se filtró y se secó al vacío sobre P₂O₅/KOH y parafina, mientras el desecante se cambiaba varias veces.

Rendimiento: 1,03 g (1,64 mmoles) 69,0%.

15 Rf – 0,063 (isopropanol: ácido fórmico: agua) (20:5:1) (2:1:1).

0,745 (cloroformo: metanol: amoniac) (8:1,75:0,25);

V. Producción de H-Thr-Lys-Pro-Phe-OH

20 Se añadieron 1,03 g (1,64 mmoles) de Boc-Thr-Lys (Boc)-Pro-Phe-OH a 8,2 mL de cloruro de metileno y 8,2 ml de TFA, después la mezcla se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente, y, después de eliminar los grupos protectores, la disolución se evaporó 2 veces con metanol absoluto, 2 veces con benceno, y 2 veces con éter. Se precipitó con éter desde metanol. El residuo se secó al vacío sobre P₂O₅ KOH y parafina. El precipitado resultante se disolvió en 5 ml de etanol al 30% y se aplicó a la columna Amberlyst A-21 (forma AcO⁻) para el intercambio de sal de acetato/hidrocloruro. El péptido se eluyó con 100 ml de etanol al 30%, se evaporó hasta sequedad al vacío y se precipitó con éter absoluto desde metanol absoluto. El precipitado resultante se filtró y se secó en un desecador al vacío sobre P₂O₅, KOH y parafina, mientras el desecante se cambiaba varias veces.

25 Rendimiento: 0,7 g (1,43 mmoles) (87%).

Punto de fusión 129-131°C

Rf: - 0,201 (butanol: ácido acético: piridina: agua) (30:6:20:24);

0,156 (cloroformo: metanol: amoniac) (4:4,5:1,5).

30 El análisis cromatográfico y espectrométrico de masas de las secuencias peptídicas, descritas en los Ejemplos 1-7, se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Núm.	Péptido	PM	Características cromatográficas		Características espectrométricas de masa	
			Tr, min	Pureza, %	*[M+H] ⁺	Fragmentación del pico iónico molecular**
1	Thr-Lys-Pro-Arg-Pro	597	8,01	97	598	369(100), 272(31), 580(29)
2	Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Phe	744	14,8	96	745	516(100), 0,263(59), 327(38)
3	Pro-Arg-Pro-Gly-Pro	522	9,14	89	523	25(100), 0,425(27), 407(11)
4	Thr-Lys-Pro-Arg	500	5,72	94	501	457(100), 0,272(55), 484(47)
5	Arg-Pro-Gly-Pro	425	6,82	85	426	408(100), 293(54), 254(24)
6	Pro-Gly-Pro	269	5,42	>98	270	173(100), 155(98), 116(75)
7	Thr-Lys-Pro	344	4,15	93	345	230(100), 129(19), 212(16)
8	Thr-Lys	247	1,77	95	248	230(100), 129(78), 84(30)
	Thr-Lys-Pro-Phe	500	5,72	94	501	457(100), 0,272(55), 484(47)

Nota.

* Pico molecular que corresponde a $[M+H]^+$

** Los iones más intensos formados en la fragmentación del pico iónico molecular a la energía de colisiones con átomos de helio de 35 eV.

- 5 La Tabla 2 muestra los datos de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) usando el sistema cromatográfico líquido de microcolumna Millichrome A-02 y características espectrométricas de masa de péptidos sintetizados obtenidos usando el espectrómetro de masas ThermoElectron LCQ Advantage MAX.

Las condiciones cromatográficas desarrolladas permiten obtener fácilmente el producto cromatográficamente homogéneo.

- 10 Condiciones cromatográficas para el análisis de péptidos.

Cromatógrafo: Milichrom-A02

Columna: Prontosil 120-5C18aq, 2*75 mm

Eluyente A: LiClO_4 0,2 M + HClO_4 5 mM

Eluyente B: metanol

- 15 La tabla 2 presenta la forma de gradiente para la separación de los péptidos sintetizados.

Tabla 2

Tiempo	% de B
0	5
16,5	80

Caudal: 150 $\mu\text{l}/\text{min}$

Conjunto de longitudes de onda: 210, 220, 230, 240 nm

Condiciones de espectrometría de masas

- 20 Equipo: ThermoElectron LCQ Advantage MAX

Fuente de iones: electropulverizado; introducción directa de la disolución peptídica con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en ácido acético al 0,1% a un caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Fragmentación iónica molecular a 35 eV mediante colisiones iónicas (He).

Temperatura de la fuente: 250°C

- 25 Potencial de ionización 3,5 kV

Ejemplo 8. Identificación de la posición del farmacóforo.

Para identificar el farmacóforo, se sintetizaron fragmentos del péptido parental Selank: Thr-Lys; Thr-Lys-Pro; Pro-Gly-Pro; Arg-Pro-Gly-Pro; Pro-Arg-Pro-Gly-Pro; y se realizaron pruebas de eficacia *in vivo* usando el modelo pre-clínico relevante (prueba de lordosis).

- 30 Se estudió la eficacia del siguiente grupo de péptidos: Thr-Lys; Thr-Lys-Pro; Pro-Gly-Pro; Arg-Pro-Gly-Pro; Pro-Arg-Pro-Gly-Pro en la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{rata}$ en relación con el comportamiento sexual de ratas hembra. El comportamiento sexual se grabó en hembras hormonalmente estimuladas ovariectomizadas en contacto directo con el macho sexualmente activo, o cuando dicho contacto era imposible. Se encontró que el péptido Thr-Lys-Pro aumentó la intensidad del comportamiento proceptivo en hembras de 14 ± 4 a 29 ± 6 actos durante la monitorización ($p = 0,028$, prueba de Wilcoxon). El efecto en la reacción de lordosis en hembras tuvo la misma tendencia ($p = 0,09$): el número de lordosis bajo la acción del péptido Thr-Lys-Pro aumentó de $0,73 \pm 0,12$ a $0,97 \pm 0,12$. Estos resultados indican la intensificación de la motivación sexual en el entorno de la acción del péptido Thr-Lys-Pro. El efecto es específico y se manifestó en una situación de comportamiento adecuada. Los resultados de los estudios de eficacia de los siguientes péptidos: Thr-Lys; Thr-Lys-Pro; Pro-Gly-Pro; Arg-Pro-Gly-Pro; y Pro-Arg-Pro-Gly-Pro; en el modelo de lordosis se muestran en la Tabla 3.
- 35
- 40

Tabla 3

Grupo	Progesterona, mg/rata	Producto de prueba, µg/rata	Número de actos de comportamiento proceptivo	Porcentaje de lordosis
Control negativo	0,5	0	14±4	0,73±0,12
Thr-Lys	0,5	100	13±4	0,70±0,02
Thr-Lys-Pro	0,5	100	29±6	0,97±0,12
Pro-Gly-Pro	0,5	100	13±5	0,74±0,09
Arg-Pro-Gly-Pro	0,5	100	15±4	0,69±0,14
Pro-Arg-Pro-Gly-Pro	0,5	100	14±6	0,73±0,14
Control positivo	1,0	0	22±11	0,98±0,09

La Tabla 3 prueba que el tripéptido Thr-Lys-Pro es el farmacóforo; además, la secuencia más pequeña, es decir, el dipéptido Thr-Lys, no funciona, como resulta de la Tabla 3.

5 Ejemplo 9. Prueba de farmacóforo

Para probar el farmacóforo, se sintetizaron péptidos basados en él, viz. Tripéptido Thr-Lys-Pro, tetrapéptidos Thr-Lys-Pro-Arg y Thr-Lys-Pro-Phe, pentapéptido Thr-Lys-Pro-Arg-Pro, y hexapéptido Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Phe, que corresponden a la fórmula general A-Thr-Lys-Pro-B-C-D-X, las pruebas de eficacia se realizaron en *in vivo*, usando modelos pre-clínicos relevantes (prueba de lordosis).

- 10 Se estudió la eficacia del siguiente grupo de péptidos: Thr-Lys-Pro; Thr-Lys-Pro-Arg; Thr-Lys-Pro-Arg-Pro; y Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Phe; a una dosis de 100 µg/rata en relación con el comportamiento sexual de las ratas hembra. El comportamiento sexual se grabó en hembras hormonalmente estimuladas ovariectomizadas en contacto directo con el macho sexualmente activo, o cuando dicho contacto fue imposible. Se encontró que los péptidos del grupo, que incluyen Thr-Lys-Pro, Thr-Lys-Pro-Arg-Pro y Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Phe, aumentaron la intensidad del comportamiento proceptivo en hembras de 14±4 a 26±4 - 36±6 actos durante la monitorización ($p=0,028$, prueba de Wilcoxon). Al mismo tiempo, Thr-Lys-Pro-Arg y Thr-Lys-Pro-Phe no afectan a la intensidad del comportamiento proceptivo de hembras y no aumenta el número de lordosis, y los parámetros básicos de los tetrapéptidos Thr-Lys-Pro-Arg y Thr-Lys-Pro-Phe permanecen al nivel del control negativo. El efecto en la reacción de lordosis en hembras tuvo la misma tendencia ($p=0,09$). En ausencia del contacto directo de compañeros, la acción del péptido se manifestó. Los resultados indican la intensificación de la motivación sexual en el entorno de la acción peptídica de Thr-Lys-Pro, Thr-Lys-Pro-Arg-Pro, Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Phe y la carencia del efecto de motivación sexual en tetrapéptidos Thr-Lys-Pro-Arg y Thr-Lys-Pro-Phe. El efecto es específico y se manifestó en una situación de comportamiento adecuada. Los resultados de los estudios de eficacia de los siguientes péptidos: Thr-Lys-Pro; Thr-Lys-Pro-Arg; Thr-Lys-Pro-Phe; Thr-Lys-Pro-Arg-Pro; Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Phe; en el modelo de lordosis se muestran en la Tabla 4.

25 Tabla 4

Grupo	Progesterona, mg/rata	Producto de prueba, µg/rata	Número de actos de comportamiento proceptivo	Porcentaje de lordosis
Control negativo	0,5	0	14±4	0,73±0,12
Thr-Lys-Pro	0,5	100	28±4	0,96±0,12
Thr-Lys-Pro-Arg	0,5	100	14±4	0,72±0,02
Thr-Lys-Pro-Phe	0,5	100	13±5	0,73±0,09
Thr-Lys-Pro-Arg-Pro	0,5	100	36±6	0,99±0,09
Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Phe	0,5	100	26±4	0,94±0,14
Control positivo	1,0	0	22±11	0,98±0,09

Aplicabilidad industrial

5 La invención se refiere al campo de la bioquímica, en particular, a un método para producir péptidos que muestran alta actividad y capaces de estimular la auto-curación en los órganos donde se da una perturbación. En particular, la invención permite ampliar la gama de herramientas para la estimulación de la función sexual y el tratamiento de la disfunción sexual, mientras reduce la duración de la terapia y los costes de medicamentos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un péptido de fórmula:
Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-X, en donde X es un grupo OH, OCH₃ o NH₂.
2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde X es OH.
- 5 3. Un péptido de fórmula Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-X, para usar como un producto medicinal, en donde X es un grupo OH, OCH₃ o NH₂.
4. El péptido como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para usar en la estimulación de la función sexual o reproductiva.
- 10 5. El péptido como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para usar en la prevención o tratamiento de la disfunción sexual o reproductiva.
6. Un método no terapéutico para intensificar la motivación sexual, que comprende la administración del péptido como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.

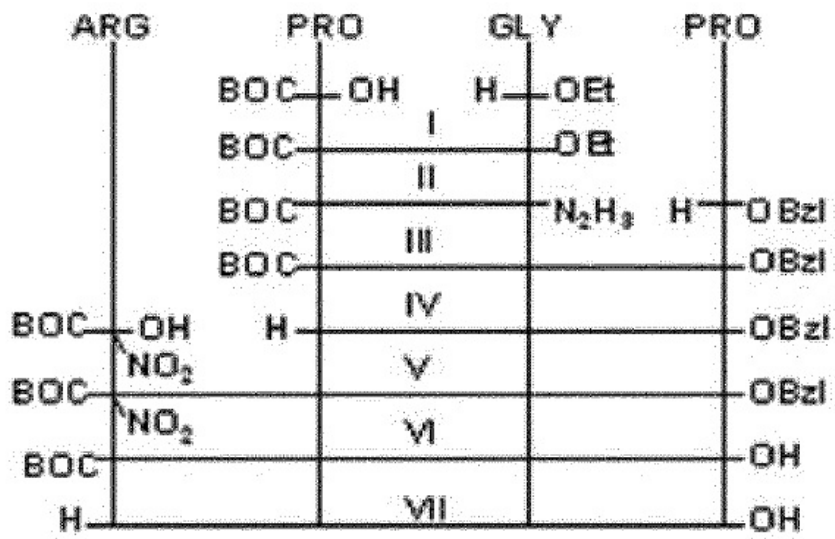


Figura 1

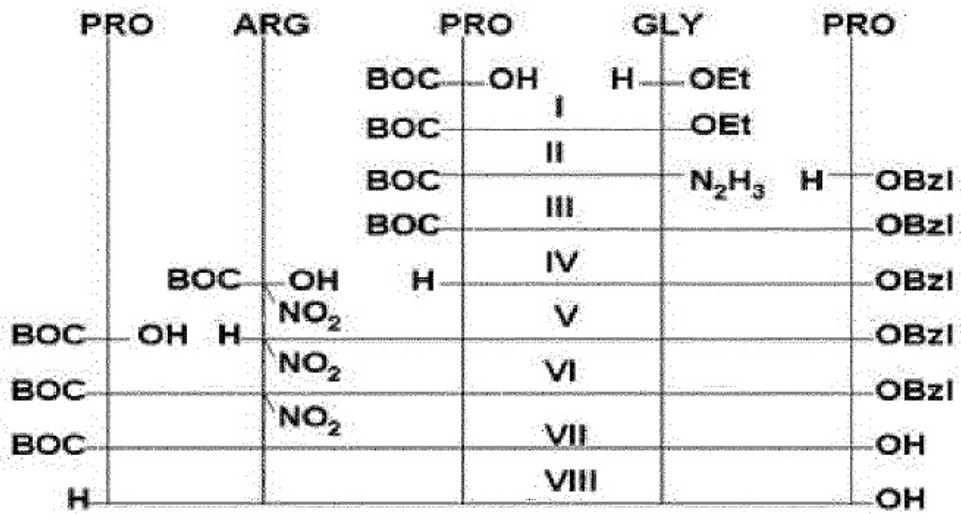


Figura 2

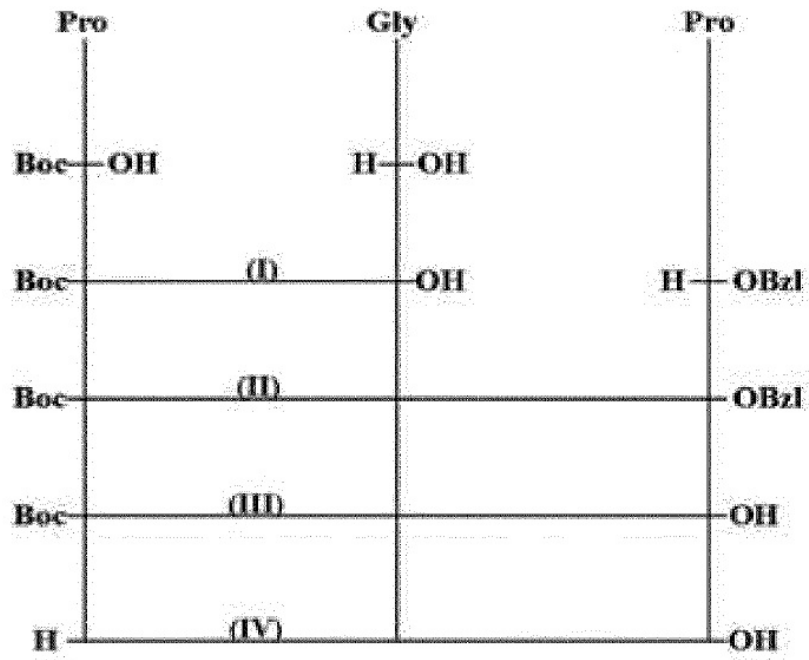


Figura 3

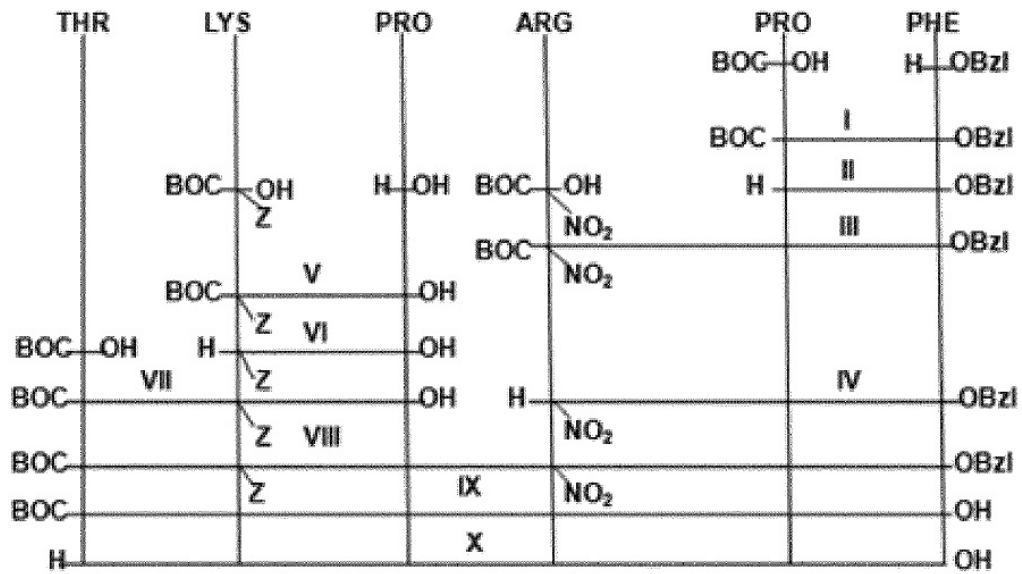


Figura 4

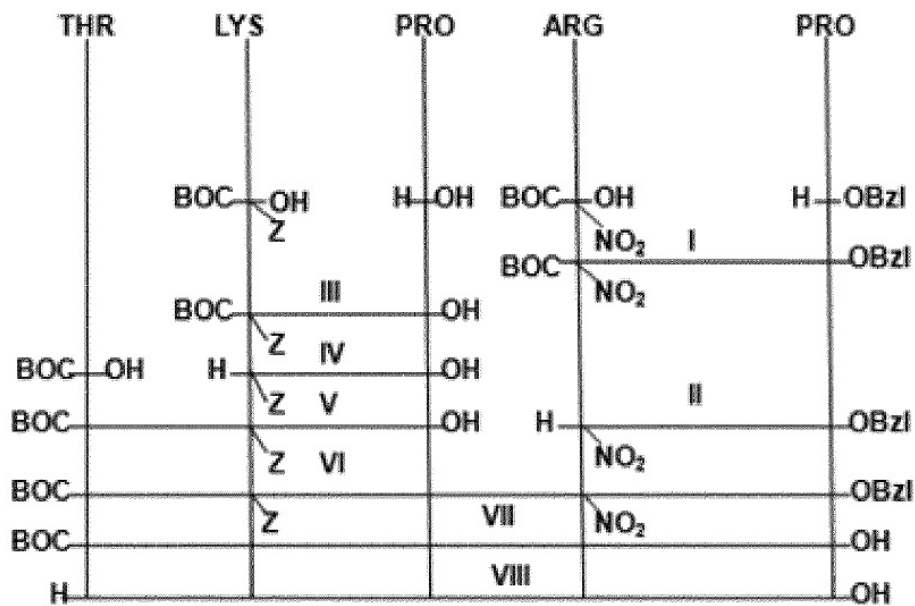


Figura 5

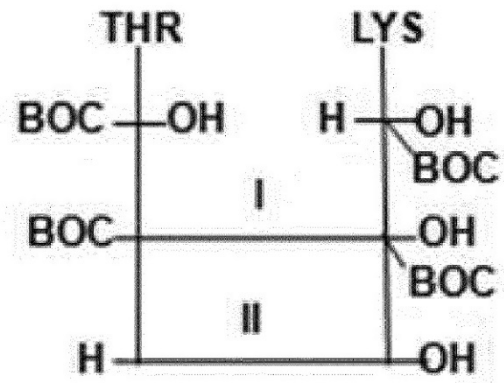


Figura 6

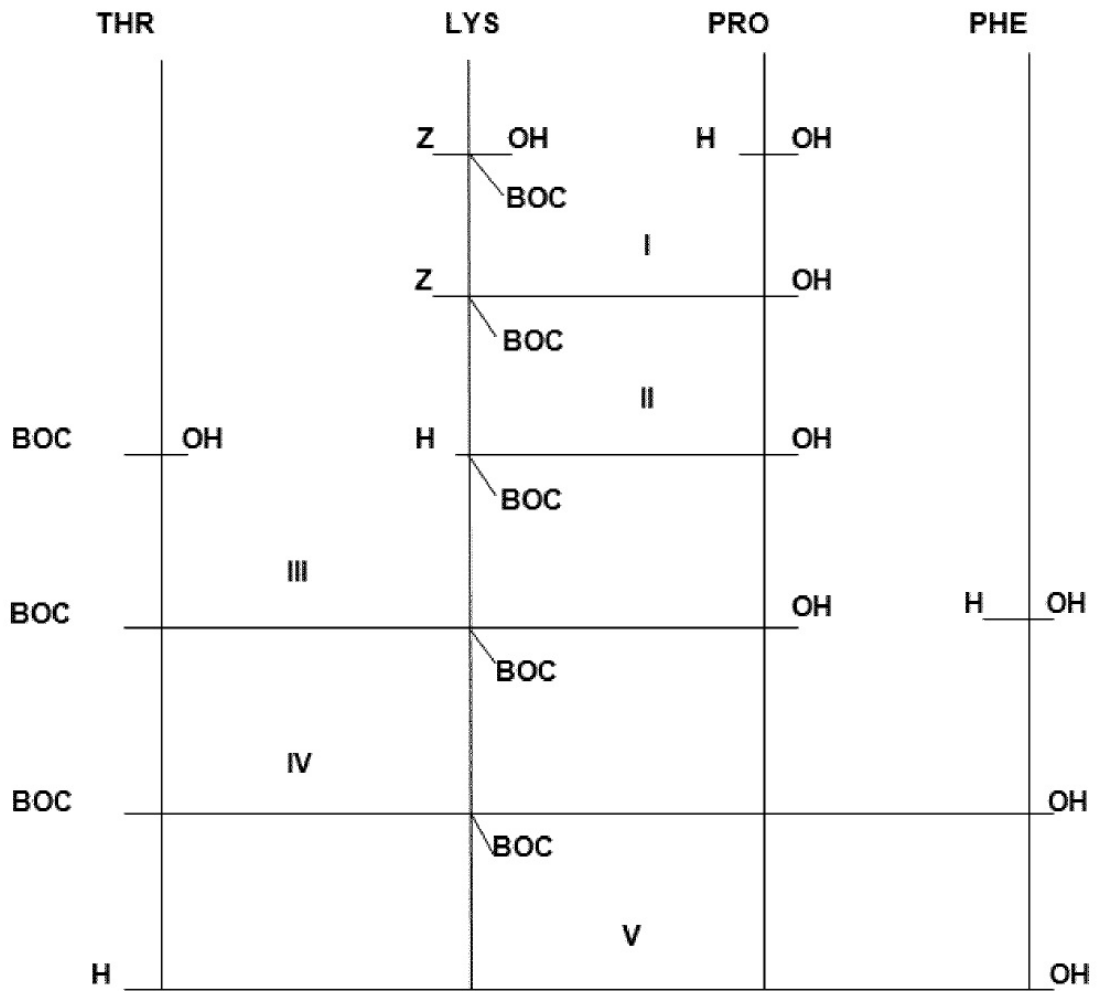


Figura 7